

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-289854

(43)Date of publication of application : 14.10.2003

(51)Int.Cl. C12N 1/20
A01N 63/00
// (C12N 1/20
C12R 1:07)

(21)Application number : 2002-373037 (71)Applicant : MIROKU TECHNOLOGY:KK

(22)Date of filing : 24.12.2002 (72)Inventor : MURAYAMA HATSUKO
KONDO HISAE

(30)Priority

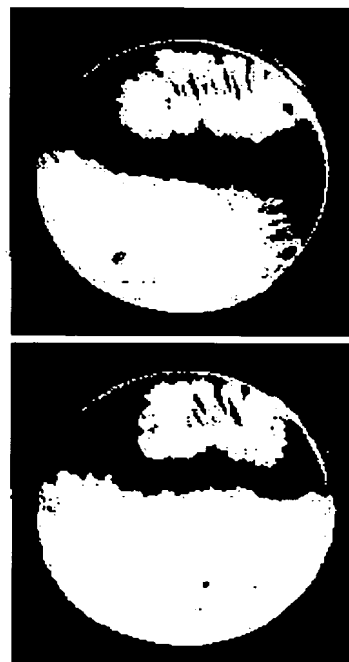
Priority number : 2002024545 Priority date : 31.01.2002 Priority country : JP

(54) BACTERIAL STRAIN BELONGING OR CLOSELY RELATING TO BACILLUS MOJAVENSIS AND MOLD-CONTROLLING AGENT CONTAINING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new bacterial strain, drug preparation and method for effectively controlling various molds causing various kinds of blight such as white root rot of plants such as fruit trees.

SOLUTION: This invention relates to a mold-controlling agent containing a bacterial strain belonging or closely relating to *Bacillus mojavensis* and having a mold-controlling activity, a cultured product of the strain, a mold-controlling agent containing the strain and/or the cultured product as effective components (active components), and a method for controlling white root rot, botrytis rot, or the like, by applying the mold-controlling agent.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application]

other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-289854

(P2003-289854A)

(43) 公開日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A 4 B 0 6 5
			E 4 H 0 1 1
A 0 1 N 63/00		A 0 1 N 63/00	F
// (C 1 2 N 1/20		C 1 2 R 1:07	
C 1 2 R 1:07)			

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2002-373037 (P2002-373037)

(22) 出願日 平成14年12月24日 (2002. 12. 24)

(31) 優先権主張番号 特願2002-24545 (P2002-24545)

(32) 優先日 平成14年1月31日 (2002. 1. 31)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年10月17日～19日 神奈川県産業技術総合研究所主催の「平成13年度神奈川県産学公交流研究発表会」において文書をもって発表

(71) 出願人 301019264

有限会社ミロクテクノロジー

千葉県船橋市宮本9丁目11番1号

(72) 発明者 村山 肇子

東京都港区高輪2-1-11-323

(72) 発明者 近藤 久恵

神奈川県横浜市青葉区美しが丘西3-60-31

(74) 代理人 100100181

弁理士 阿部 正博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Bacillus mojavensis* に属するか又は近縁である細菌、及びそれを含むカビ防除剤

(57) 【要約】

【課題】 果樹等の植物における様々な病害の原因となる白紋羽病等の様々なカビを有効に防除する新たな細菌、薬剤、及び方法を提供することを目的とするものである。

【解決手段】 *Bacillus mojavensis* に属するか又は近縁であり、カビ防除作用を有する細菌、該細菌の培養処理物、該細菌及び／又はその培養処理物を有効成分（活性成分）としてを含むカビ防除剤、及びかかるカビ防除剤を施用することを特徴とする白紋羽病及び灰色カビ等に対する防除方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Bacillus mojavenensis* に属するか又は近縁であり、カビ防除作用を有する細菌。

【請求項2】 カビが子嚢菌綱に属する、請求項1記載の細菌。

【請求項3】 カビが担子菌綱に属する、請求項1記載の細菌。

【請求項4】 カビが不完全菌綱に属する、請求項1記載の細菌。

【請求項5】 カビが接合菌綱に属する、請求項1記載の細菌。 10

【請求項6】 カビが、白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*)、灰色カビ病原菌(*Botrytis cinerea*)、黒コウジカビ(*Aspergillus niger*)、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)、ヒゲカビ(*Phycomyces blakesleeana*)、ヒトヨタケ(*Coprinus cinereus*)及び菌核病菌(*Botryotinia fuckeliana*) から成る群から選択される、請求項1乃至5のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項7】 *B. s p. HK-a* (FERMP-18669) である、請求項1乃至6のいずれか一項に記載の細菌。 20

【請求項8】 *B. s p. HK-c* (FERMP-18670) である、請求項1乃至6のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項9】 請求項1乃至8のいずれか一項に記載の少なくとも一種の細菌を有効成分として含むカビ防除剤。

【請求項10】 請求項1乃至8のいずれか一項に記載の細菌の培養処理物。

【請求項11】 細菌の培養処理物が培養液の有機溶媒による抽出物である、請求項10記載の培養処理物。 30

【請求項12】 有機溶媒がn-ブタノールである請求項11記載の培養処理物。

【請求項13】 *BacillopeptinA*及び／又は*BacillopeptinB*を含む請求項11又は12記載の培養処理物。

【請求項14】 請求項10ないし13のいずれか一項に記載の細菌の培養処理物を有効成分として含むカビ防除剤。

【請求項15】 請求項9ないし14のいずれか一項に記載のカビ防除剤を施用することを特徴とする、カビ防除方法。 40

【請求項16】 請求項9ないし14のいずれか一項に記載のカビ防除剤を施用することを特徴とする、白紋羽病に対する防除方法。

【請求項17】 請求項9ないし14のいずれか一項に記載のカビ防除剤を施用することを特徴とする、灰色カビに対する防除方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は、*Bacillus mojavenensis* に属するものと推定され、カビ防除作用を有する 50

細菌、該細菌又はその生産物を有効成分として含むカビ防除剤、及び、該防除剤を施用することを特徴とする、白紋羽病等のカビに由来する各種病害に対する防除方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 カビは糸状菌とも呼ばれ、真核微生物のうち菌糸状に生育するものの総称である。カビの中には、子嚢胞子をつくる子嚢菌綱に属するもの、きのこの仲間である担子菌綱に属するもの、及び、有性生殖が知られておらず醸造及び食品製造に用いられる不完全菌綱に属するもの等がある。

【0003】 このようなカビは、又、植物等の様々な病害の原因となることが知られている。代表的な例として、イチゴ、ブドウ、トマト、パサ等の多くの植物に灰色カビ病を起こす菌として*Botrytis cinerea*が知られており、更に、カビ毒を生成するものもある。

【0004】 又、白紋羽病は、子のう菌の一種である白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*)による重要な土壌病害であり、リンゴ、ナシ、ブドウ、及びウメなど果樹並びに材木等の永年作物、更にはダイズ及びスイセン等の草本植物を含む63属170種類以上の植物を侵す多犯性の菌として知られている。本病の罹病植物は他の土壌病害と同様に、生育不良、衰弱、萎凋、黄化、根腐れ、及び早期落葉などが起こり枯死する。罹病植物体の地際部には特異的な白色～灰褐色の扇状の白色菌糸膜、菌糸束及び分生子柄束などが認められる。本病による永年作物の被害は大きく、土壤中及び罹病根上では疑似細核で生存し、その生存力は強く、防除の困難な土壌病害とされている。尚、白紋羽病に関しては、「植物土壌病害の事典」、渡辺恒雄著、朝倉書店、211頁～217頁(1998年)で詳細に解説されている。

【0005】 現在のところ、白紋羽病に対しての化学合成物質による農薬としては、クロルピクリン剤、イソプロチオン剤、チオファネートメチル剤、及びベノミル剤などが知られているが、確實有効なものがないのが現状である。更に、消費者の環境保全に対する意識及び食品に対する安全志向は益々高まりを見せており、大量の化学合成物質を使用する農薬漬けの作物栽培から有機・無農薬による作物栽培への転換等が急務となっている。

【0006】 そこで、これまでに、化学合成殺菌剤に代えて、微生物を使用する防除方法が提案されている。例えば、桑白紋羽病の防除方法として、放線菌を用いる方法が提案されている(「根圏環境の動態解明と制御技術の開発」農林技術会議事務局研究成果274号、1992年、49～51ページ)。更に、特開平6-256125号にはトリコデルマ属菌を含むによる白紋羽病防除剤及び白紋羽病防除方法が開示されている。又、特開平10-36211号にはグリオクラディウム属に属する真菌を含有することを特徴とする白紋羽病防除剤及び白紋羽病防除方法が開示されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、白紋羽病及び灰色カビ等の様々なカビを有効に防除する新たな方法を提供することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、*Bacillus mojavensis* に属するか又は近縁であり、カビ防除作用を有する細菌、該細菌の培養処理物、該細菌及び／又はその培養処理物を有効成分（活性成分）としてを含むカビ防除剤、及びかかるカビ防除剤を施用することを特徴とする白紋羽病及び灰色カビ等に対する防除方法に係る。

【0009】ここで、カビには、特に、子囊菌綱、担子菌綱、不完全菌綱、及び、接合菌綱に属するものとして当業者に公知の任意ものが含まれる。具体的には、例えば、白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*)、灰色カビ病原菌 (*Botrytis cinerea*)、黒コウジカビ (*Aspergillus niger*)、アカバシカビ (*Neurospora crassa*)、ヒゲカビ (*Phycomyces blakesleeana*)、ヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) 及び菌核病菌 (*Botryotinia fuckeliana*) 等を挙げることが出来る。

【0010】本発明の細菌としては、本明細書において後述するような平板試験により、土壌病害の病原菌である白紋羽病菌及び灰色カビ等のカビに対して、有意な増殖抑制効果を示す菌株を適宜選択して使用することができる。又、本発明の防除剤は、一種又は複数種の細菌を含むことが出来る。

【0011】このような条件を満たしている限り本発明で使用し得る細菌に特に制限はないが、その例として、*B. sp. HK-a* (FERMP-18669) 及び *B. sp. HK-c* (FERMP-18670) を挙げることが出来る。これらの菌株は、平成13年12月27日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0012】上記の2種類の菌株は、土壌中から実施例に示した手順により単離されたものである。

【0013】本発明の細菌は、当業者に公知の任意の方法で培養することが出来る。例えば、寒天培地 (PDA培地及びLB培地等)、PYM培地、MYS-IV培地、ポテト培地、並びにポテト・酵母培地等を使用して、27℃～55℃の温度範囲で培養することが出来る。

【0014】*Bacillus mojavensis* に属するか又は近縁である本発明の細菌等を有効成分として含む本発明の防除剤は、乾燥粉状、顆粒状、ペースト状及び液状等の任意の形態及び性状を取ることが可能である。例えば、該細菌の培養後に、遠心分離等の適当な方法で分離された一種の該細菌又はそれら数種類の混合物から成る細菌それ自体、又は、細菌を適当な方法で培養して得られる培養物 (固形状又は液状等) それ自体、若しくは該培養物

に必要に応じて、アセトン、酢酸エチル及びn-ブタノール等の有機溶媒による溶解及び／又は抽出、濾過、粉碎、遠心分離、濃縮及び／又は乾燥等の処理を適宜施して得られる培養処理物又は細菌の生産物を本発明の防除剤の有効成分として挙げることが出来る。

【0015】更に、こうした細菌それ自体、培養物又は培養処理物を適当な担体に担持させ、又は固定化させた担持物の形態 (例えば、粒状) で本発明のカビ防除剤として使用することもできる。該担体としては、有機質及び無機質のいずれのものでも使用でき、有機質及び無機質の両方を含むものでもよい。具体的には、例えば、アタパルジャイト、モンモリロナイト、ゼオライト、赤玉土、鹿沼土、黒ボク土、赤玉土、焼成赤玉土、パーミキュライト、バーライト、化石貝等の無機物、または、ビートモス、木炭等の炭類、バルブ、藁、バガス、油かす、魚かす、骨粉、血粉、カニガラ、及び各種堆肥等の有機物、更には、前記の有機素材、並びにそれらの混合物が挙げられる。その中では、保水能、保肥能あるいは使用上の利便性の観点より、アタパルジャイト、モンモリロナイト、ゼオライト、ビートモス、木炭等の多孔質担体が好ましい。

【0016】本発明のカビ防除剤には、更に、当業界で公知の任意の補助剤又は添加剤等を適宜含有させることが出来る。このような補助剤又は添加剤の例としては、例えば、酢酸、プロピオン酸、乳酸及び酪酸のような有機酸、蔗糖蜜、木酢液、デンプン、乳糖、並びにリン酸等の好熱性細菌の栄養源又は基質となり得る物質等を挙げることが出来る。本発明の防除剤における、細菌と担体及び／又は補助剤又は添加剤等との混合割合は、防除剤の形態及び性状、使用の目的、頻度及び方法、並びに各成分の種類等に応じて当業者が適宜選択することが出来る。

【0017】本発明は更に、かかる本発明のカビ防除剤を施用することを特徴とするカビ、特に、白紋羽病及び灰色カビに対する防除方法に係る。

【0018】本発明方法の実施に際しては、防除剤に加えて、その他の成分として、有機酸組成物、リン酸及び担体を施用することもできる。有機酸組成物は防除剤に含まれる細菌の栄養源及び／又は白紋羽病菌に対する殺菌剤として機能し、又、担体は細菌がそれに固定されて土壌中で安定して増殖できるような環境を提供するものと考えられる。しかしながら、このような有機酸組成物及び担体の機能については未知・不確定の要素もあり、これらが果たす機能によって本発明の範囲が限定されるものではない。

【0019】有機酸組成物とは有機酸を主成分として含有し任意の形態をとり得る組成物であって、例えば、酢酸、プロピオン酸、乳酸及び酪酸のような有機酸を少なくとも一種類含む液体、例えば、有機酸水溶液、又は木酢液等を挙げることが出来る。ここで、木酢液とは、一

般に、木材を乾留する際に得られる水溶性溶液をいう。その組成及び品質は、原料として使用する木材（樹種）、かまの構造及び種類、採取保管装置の構造、採取温度（排煙口温度）等の各条件によって異なるが、酢酸、プロピオン酸、乳酸及び酪酸のような有機酸を主成分として、各種有機フェノール、アルデヒド等のカルボニル化合物、アルコール類、塩基、並びにその他の中性成分等が含まれている（丸善：「木材工業ハンドブック」林業試験場編、1972年；創森社刊：「木酢液・炭と有機農業」三枝敏郎著、2000年8月）。又、担

10 体としては上記の木炭等の多孔質担体を挙げることが出来る。

【0020】更に、本発明のカビ防除剤等の他に、当該技術分野で公知の土壤改良剤、有機及び／又はリン酸等の無機肥料等の成分を任意に施用することが出来る。

【0021】本発明の白紋羽病及び灰色カビ等の各種カビに対する防除方法において、防除剤を施用する対象となる植物に特に制限はなく、これらのカビに罹患し得る植物は全て本発明方法の対象となり得る。例えば、スギ、サワラ、ツガ、カラマツ、カエデ、クスノキ、ポプラ、ケヤキ、ナラ、カシ、ブナ、ハゼ、サクラ、コウゾ、ミツマタ、クワ、チャ、柑橘類、イチゴ、ブドウ、トマト、バラ、リンゴ、カキ、ナシ、モモ、スモモ、ウメ、アンズ、オウドウ、ビワ、イチジク、トウヒ、サツキ、ツツジ、クチナシ、ツゲ、マサキ、イチョウ、ウルシ、ハクウンボク、クリ、及びクヌギなどの植物を挙げることができる。

【0022】本発明のカビ防除方法において使用するカビ防除剤に活性成分として含まれる *Bacillus mojavensis* に属するか又は近縁の細菌、その培養処理物及びその他の成分の種類及び量、並びに、防除剤、有機酸組成物、担体等の種類、量及びそれらの割合は、防除剤を施用する方法、施用する時期、対象となる植物の種類、植物の栽培状況、土壌の種類、並びに病状の進行程度等の様々な条件によって、当業者が適宜選択することが出来る。更に、防除剤を施用する方法、時期等についても特に制限はなく、防除の対象となるカビの種類、防除剤に含まれる該細菌及びその他の成分の種類及び量、防除剤、有機酸組成物、担体等の種類及び量、対象となる植物の種類、植物の栽培状況、土地の種類、施用する時期、並びに病状の進行程度等の様々な条件に基づき、当業者が総合的に判断して選択することが出来る。

【0023】例えば、本発明のカビ防除剤は、10アール当り、200～300L程度の量で施用することが出来る。又、それに対して、有機組成物は、例えば、上記の酢酸、プロピオン酸、乳酸及び／又は酪酸のような有機酸を少なくとも一種類含む水溶液の場合には、10アール当り、1～10L程度の量で施用することが出来る。更に、例えば、木炭のような担体は、例えば、10アール当り、100～200L程度の量で施用すること

が出来る。又、異なる種類の細菌を含む数種類の本発明のカビ防除剤を、本発明方法において適宜組み合わせて施用することも可能である。

【0024】本発明の防除方法における具体的な施用方法の例としては、例えば、罹患植物体の葉、及び根等の各部に本発明の防除剤を直接塗布又は散布したり、根を防除剤中に浸漬する方法、罹患した根の周囲の土壌に防除剤及びその他の任意成分を灌注する方法、罹患植物体の根の周りの土壌を除去し、根の周りにできた穴の中に防除剤及びその他の任意成分を注入する方法などがある。又、防除剤とその他の任意成分は同時に施用する必要はなく、適当な間隔で施用することも出来る。更に、防除剤とその他の任意成分を均質な状態で混合して施用することもなく、例えば、防除剤とその他の任意成分を交互に重層的に施用することも可能である。更に、例えば、住居の壁等に生育する黒カビ等に対して施用する場合には、散布等の適当な手段により本発明の防除剤をカビに直接に適用することが出来る。

【0025】更に、本発明の防除方法には、植物体が白紋羽病及び灰色カビ等のカビに罹患する前に、予め予防処置として、本発明の防除剤を施用することも含まれる。又、対象となる植物体を栽培する前に、本発明の防除剤等で予め土壌を処理することも本発明の防除方法に含まれる。

【0026】これらの各種の方法は、適当に組み合わせて実施したり、更に、罹患植物体の状態等に応じて、適当な間隔で複数回実施することも可能である。

【0027】

【実施例】以下、実施例により更に詳細に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0028】

【実施例1】*Bacillus mojavensis* と推定される細菌の単離・培養

【0029】土壌0.1gを10mlの滅菌水に懸濁し、これを1mlづつに分注して計5試料作成し、各々40℃、50℃、60℃、70℃及び80℃で1時間処理後、各試料から200μl採り、1cm四方に切断した濾紙にしみ込ませた。1.5%寒天を含むMY培地（石川辰夫編「微生物遺伝学実験法」共立出版（株）247頁）上で、カビ（白紋羽病菌）を一方の辺に接種し、これと対角線の辺にこの懸濁液をしみ込ませた濾紙を置き、27℃で静置培養し、抗カビ効果に依る阻止線の出現を観察した。その結果、50℃及び60℃で処理した濾紙に依る阻止線の出現が観られたので、これらの濾紙上の微生物から増殖したものの懸濁液をPDA (Potato Dextrose Agar) 培地（DIFCO 品番213400 (0013-17)）において27℃で培養し、単集落を形成させた処、11種類の集落形態が観察された。これら形態の異なる単集落を各々単離し、抗カビ効果の有無を調べた処、2種類の菌株に抗カビ効果

が観られ、これら2株を、夫々、「B. sp. HK-a」及び「B. sp. HK-c」と命名した。

【0030】

【実施例2】菌株B. sp. HK-a及びB. sp. HK-cの同定及び菌学的性質

上記のように単離・培養されたB. sp. HK-a（単*

＊に、「HK-a」と表記）及びB. sp. HK-c（単に、「HK-c」と表記）の2つの菌株について形態学的性質及び培養的性質に関して同定試験を行った。その結果を以下の表1に示す。

【0031】

【表1】

細菌同定第1段階結果

検体番号	HK-a	HK-c
培養温度 ℃	30	30
細胞形態	桿菌 (0.8×2.0 μm)	桿菌 (0.8×2.0~2.5 μm)
グラム染色	不定	不定
孢子	+	+
運動性	-	-
コロニー形態	培地：普通寒天 培養時間：48 h 円形 周縁やや波状 凸状 無光沢 クリーム色	培地：普通寒天 培養時間：48 h 円形 周縁やや波状 凸状 無光沢 クリーム色
培養温度 ℃	37	+
	45	+
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
OFテスト (グルコース)	-	-
追加試験		
同定の結果	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

+:陽性、-:陰性、?:反応弱

【0032】更に、これらの生理学的性質及び培養的性質等の菌学的性質をより詳細に調べるための試験を実施した。B. sp. HK-aに関する結果を表2及び表3、並びにB. sp. HK-cに関する結果を表4及び

表5に示す。

【0033】

【表2】

同定第2段階結果

検体『HK-a』

API 50CHB の測定方法 (製品番号 50430) に従いました。

0 - GLY - ERY - DARA - LARA + RIB - DXYL - LXYL - ADO - MDX -
 BAL - GLU + FRU + MNE + SBE - RHA - DUL - INO + MAN + BOR -
 MDM - MDG + NAG + AMY + ARB + ESC + BAL + CEL + MAL + LAC -
 MEL - SAC + TRE + INU - MLZ - RAF - AMD + GLYG + XLT - GEN +
 TUR + LYX - TAG + DFUC - LFUC - DARL - LARL - GNT - 2KG - 5KG -
 ONPG + ADH + LDC - ODC - CIT - H2S - URE - TDA - IND - VP +
 GEL - NIT +

項目	基質成分	項目	基質成分	項目	基質成分
GLY	グリセロール*	NAG	N-アセチルグルコサミン*	DFUC	D-フコース*
ERY	エリスリトール*	AYM	アミグダリン*	LFUC	L-フコース*
DARA	D-アラビノース*	ARB	アルブチン*	DARL	D-アラビトール*
LARA	L-アラビノース*	ESC	エスクリン*	LARL	L-アラビトール*
RIB	リボース*	SAL	サリシン*	GNT	グルコネート*
DXIL	D-キシロース*	CEL	セロビオース*	2KG	2-ケトグルコン酸*
LXIL	L-キシロース*	MAL	マルトース*	5KG	5-ケトグルコン酸*
ADO	アドニトール*	LAC	乳糖*	ONPG	β -ガラクトシダーゼ**
MDX	β -メチル-D-キシロース*	MEL	メリビオース*	ADH	アルギニンジヒドロラーゼ**
GAL	ガラクトース*	SAC	白糖*	LDC	リシンデカルボキシラーゼ**
GLU	グルコース*	TRE	トレハロース*	ODC	オルニチンデカルボキシラーゼ**
FRU	フラクトース*	INU	イヌリン*	CIT	クエン酸の利用性**
MNE	マンノース*	MLZ	メレチトース*	H2S	H ₂ S 産生**
SBE	ソルボース*	RAF	ラフィノース*	URE	ウレアーゼ**
RHA	ラムノース*	AMD	腺粉*	TDA	トリプトファンデアミナーゼ**
DUL	ズルシトール*	GLYG	グリコーゲン*	IND	インドール産生**
INO	イノシトール*	XLT	キシリトール*	VP	アセトイン産生(VP)**
MAN	マンニトール*	GEN	ゲンチオビオース*	GEL	ゼラチナーゼ**
SOR	ソルビトール*	TUR	D-ツラノース*	NIT	硝酸塩還元**
MDM	α -メチル-D-マンノース*	LYX	D-リキソース*		
MDG	α -メチル-D-グルコース*	TAG	D-タガトース*		

0=control, *発酵性基質, **生化学試験

【0034】

【表3】

追加試験

[0035]

[表4]

50℃での生育性	+
嫌気での生育性	+
10%NaClでの生育性	+
カゼイン加水分解性	+
馬尿酸塩加水分解性	-

特許用追加性状試験

栄養的性質

肉汁液体培養

表面膜形成

リトマス・ミルク

-

10

生理学的性質

脱窒反応

-

MR テスト

-

クエン酸の利用性 (Koeber 培地)

+

クエン酸の利用性 (Christensen 培地)

+

無機窒素源(NaNO_3)

+

無機窒素源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

+

糖類からの酸 / ガス産生

L-アラビノース

+ / -

D-フラクトース

- / -

マルトース

- / -

ラクトース

- / -

D-ソルビトール

- / -

イノシトール

- / -

デンプン

- / -

D-キシロース

- / -

D-マンノース

- / -

D-ガラクトース

- / -

シュクロース

+ / -

D-マンニトール

- / -

グリセリン

+ / -

20

検体「HK-C」

API 50CHB の測定方法 (製品番号 50430) に従いました。

0	-	GLY	-	ERY	-	DARA	-	LARA	+	RIB	-	DXYL	-	LXYL	-	ADO	-	MDX	-
GAL	-	GLU	+	FRU	+	MNE	+	SBE	-	RHA	-	DUL	+	INO	+	MAN	+	SOR	-
MDM	-	MDG	+	NAG	+	AMY	+	ARB	+	ESC	+	SAL	+	CEL	+	MAL	+	LAC	-
MEL	-	SAC	+	TRE	+	INU	-	MLZ	-	RAF	-	AMD	+	GLYG	+	XLT	-	GEN	+
TUR	+	LYX	-	TAG	+	DFUC	-	LFUC	-	DARL	-	LARL	-	GNT	-	ZKG	-	5KG	-
ONPG	+	ADH	+	LDC	-	ODC	-	CIT	-	H2S	-	URE	-	TDA	-	IND	-	VP	+
GEL	-	NIT	+																

項目	基質成分	項目	基質成分	項目	基質成分
GLY	グリセロール*	NAG	N-アセチルグルコサミン*	DFUC	D-フコース*
ERY	エリスリトール*	AYM	アミグダリン*	LFUC	L-フコース*
DARA	D-アラビノース*	ARB	アルブチン*	DARL	D-アラビトール*
LARA	L-アラビノース*	ESC	エスクリン*	LARL	L-アラビトール*
RIB	リボース*	SAL	サリシン*	GNT	グルコネート*
DXIL	D-キシロース*	CEL	セロビオース*	2KG	2-ケトグルコン酸*
LXIL	L-キシロース*	MAL	マルトース*	5KG	5-ケトグルコン酸*
ADO	アドニトール*	LAC	乳糖*	ONPG	β-ガラクトシダーゼ**
MDX	β-メチル-D-キシロース*	MEL	メリビオース*	ADH	アルギニンジヒドロラーゼ**
GAL	ガラクトース*	SAC	白糖*	LDC	リシンデカルボキシラーゼ**
GLU	グルコース*	TRE	トレハロース*	ODC	オルニチンデカルボキシラーゼ**
FRU	フラクトース*	INU	イヌリン*	CIT	クエン酸の利用性**
MNE	マンノース*	MLZ	メレチトース*	H2S	H ₂ S 産生**
SBE	ソルボース*	RAF	ラフィノース*	URE	ウレアーゼ**
RHA	ラムノース*	AMD	澱粉*	TDA	トリプトファンデアミナーゼ**
DUL	ズルシトール*	GLYG	グリコーゲン*	IND	インドール産生**
INO	イノシトール*	XLT	キシリトール*	VP	アセトイン産生(VP)**
MAN	マンニトール*	GEN	ゲンチオビオース*	GEL	ゼラチナーゼ**
SOR	ソルビトール*	TUR	D-ツクノース*	NIT	硝酸還元**
MDM	α-メチル-D-マンノース*	LYX	D-リキソース*		
MDG	α-メチル-D-グルコース*	TAG	D-タガトース*		

0=control, *発酵性試験, **生化学試験

[0036]

[表5]

追加試験

50℃での生育性	+
嫌気での生育性	+
10%NaClでの生育性	+
カゼイン加水分解性	+
馬尿酸塩加水分解性	-

特許用追加性状試験

栄養的性質

肉汁液体培養

リトマス・ミルク

表面膜形成

生理学的性質

脱窒反応

MRテスト

クエン酸の利用性 (Koser 培地)

クエン酸の利用性 (Christensen 培地)

無機窒素源(NaNO₃)無機窒素源(NH₄)₂SO₄

糖類からの酸 / ガス産生

L-アラビノース

D-フラクトース

マルトース

ラクトース

D-ソルビトール

イノシトール

デンプン

D-キシロース

D-マンノース

D-ガラクトース

シュクロース

D-マンニトール

グリセリン

-

-

-

+

+

+

+

- / -

- / -

- / -

- / -

- / -

- / -

- / -

- / -

- / -

+ / -

- / -

- / -

【0037】以上の試験から、試験した2つの菌株のいずれも、*Bacillus mojavensis* と推定された。

【実施例3】平板上の各種カビに対する発育阻害効果試験

実施例1で調製したB. s.p. HK-a及びB. s.p. HK-cの2つの菌株が、各種カビの生育に対してどのような影響を与えるのかを微生物学・生理学・生化学的見地から明らかにする目的で、以下のような試験を実施した。

【0038】まず、本発明の各菌株を各カビ用培地に接種し、37℃で1日培養し、この近傍に各種カビを接種し、25℃にて所定期間培養することにより影響を観察した。

【0039】白紋羽病菌（千葉県農業試験場・梅本先生より譲渡）を使用し、PDA培地で11日間培養した結果を図1に示す。菌体集落の形状を観察したところ、図1に示したように、本発明菌株集落の周辺領域では白紋羽病菌の増殖が抑制されることが観察され、白紋羽病菌に対する本発明菌株の優れた防除効果が示された。

【0040】更に、B. s.p. HK-cをMY培地で1日間培養した後の培養液を遠心分離して細胞を除去した

後、4%PDAと1.5%寒天を加え、120℃で20分間滅菌処理して作成した培地で、白紋羽病菌を14日間培養した結果を図2に示す。菌体集落の形状を観察したところ、図2に示したように、顕著な白紋羽病菌の成長阻害が観察された。

【0041】同様に、灰色カビ病原菌 (*Botrytis cinerea*) (PDA培地、21~28日間培養：図3)、黒コウジカビ (*Aspergillus niger*) (PDA培地、9日間培養：図4)、アカバシカビ (*Neurospora crassa*) (MY培地、3日間培養：図5)、ヒゲカビ (*Phycomyces blakesleenus*) (S-IV培地、4日間培養：図6)、及びヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) (MY培地、8日間培養：図7) を使用して、夫々所定の期間培養した結果を図3~図7に示す。いずれの場合も、本発明菌株コロニーの周辺領域では各種カビの増殖が抑制されることが観察され、それらに対する本発明菌株の優れた防除効果が示された。

【0042】

【実施例4】培養処理物による平板上のカビに対する発

育阻害効果試験（抗菌試験）

抗菌試験に用いる検定菌として、Discomycetes (盤菌類) ビョウタケ目 Sclerotinia 科 (菌核病菌) の *Botryotinia* 属に属する *Botryotinia fuckeliana* IF05365 を用いた。

検定方法

あらかじめ滅菌したペーパードиск (Φ=6mm) 上に検定サンプルをしみこませ風乾した後、PDA培地 (ポテトデキストロース寒天培地 (Difco社製)) 上に生育する *Botryotinia fuckeliana* IF05365 に対して形成される生育阻止円 (孢子形成阻止円) を抗菌活性値として用いた。

被験試料の作成

本発明の細菌であるHK-cを以下の培地で培養した。培地 (PYM培地) : 2,4%ポテトデキストロース (Difco社製)、0,2%乾燥酵母 (Difco社製)、0,2%肉エキス (Difco社製)。

予備的な実験において、活性物質はn-ブタノールで抽出可能であることが判明した。そこで、HK-cを上記のPYM培地に接種し4,5,6日目の培養液にアセトン添加後、菌体を溶解した。引き続き、ろ過した後、減圧下アセトン除去した。得られた水溶液をpH7に調整しn-ブタノールにより抽出した。n-ブタノール層を減圧下、濃縮乾固後 (図9の "sample A" に該当する)、メタノールに溶解しペーパードиск法を用いて抗菌活性試験を行った。以下の表6の結果から明かなように、6日目の培養抽出物に最も強い抗菌活性が見出された。尚、ペーパードискの様子を図8に示した。

【0043】

【表6】

HK-c 培養抽出液の抗菌活性試験結果 (阻止円: mm)

培養日数	濃度				
	1000 μg/disk	100 μg/disk	10 μg/disk	1 μg/disk	0.1 μg/disk
4 日	8.6	7.7	-	-	-
5 日	12.7	9.4	-	-	-
6 日	14.0	9.6	7.8	-	-

【0044】上記結果に基づき、更に詳細な試験を以下のとおり実施した。即ち、HK-c株をPYM培地に於て37℃で6日間培養した。得られた培養液についてBotryotinia fuckeliana IF05365に対する抗菌活性を指標に、上記の溶*

* 媒抽出試験および熱安定性試験(80℃、5分間)を行った。その結果を以下の表7に示す。

【0045】

【表7】

活性物質の溶媒抽出試験および熱安定性試験の結果

培養液	++++		
pH 3 (熱処理)	+++		
pH 7 (熱処理)	+++		
pH 10 (熱処理)	+++		

		pH		
		3	7	10
酢酸エチル抽出層	++	++	++	++
水層	++	++	++	++
n-ブタノール抽出層	+++	++++	++	++
水層	+	+	+	+

★培養液(100%)の抗菌活性を(++++)で示した時の相対活性を表す。

【0046】更に、図9に示すスキームで各種クロマトグラフィを用いて活性物質を含むフラクション3および4を精製した。その結果、活性物質はlipopeptin類、neopeptin類、Xanthostatinなどの環状リポペプチド系抗生

30

【0047】

【発明の効果】本発明のBacillus mojavensis に属すると推定される細菌及びその培養処理物が、白紋羽病菌(Rosellinia necatrix)、灰色カビ(Botrytis cinerea)及び菌核病菌(Botryotinia fuckeliana)等の広範囲な病原性カビに対して優れた防除効果を有することが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】寒天平板培地上における白紋羽病菌に対する、本発明細菌(B. s p. HK-a (上図)及びB. s p. HK-c (下図))による発育阻止効果試験の結果

50

を示す。

【図2】白紋羽病菌に対するB. s p. HK-cをMY培地で1日間培養した後の培養液を濾過して得られた培養処理物による成長阻害を示す(上図)。尚、下図はコントロールの結果を示す。

【図3】PDA培地上における灰色カビ病原菌に対する、本発明細菌(B. s p. HK-a (上図)及びB. s p. HK-c (下図))による発育阻止効果試験の結果を示す。

【図4】PDA培地上における黒コウジカビ病原菌に対する、本発明細菌(B. s p. HK-a (上図)及びB. s p. HK-c (下図))による発育阻止効果試験の結果を示す。

40

【図5】MY培地上におけるアカバシカビ病原菌に対する、本発明細菌(B. s p. HK-a (上図)及びB. s p. HK-c (下図))による発育阻止効果試験の結果を示す。

【図6】S-IV培地上におけるヒゲカビ病原菌に対する、本発明細菌(B. s p. HK-a (上図)及びB. s p. HK-c (下図))による発育阻止効果試験の結果を示す。

【図7】MY培地上におけるヒトヨタケ病原菌に対する、本発明細菌(B. s p. HK-a (上図)及びB. s p. HK-c (下図))による発育阻止効果試験の結果

果を示す。

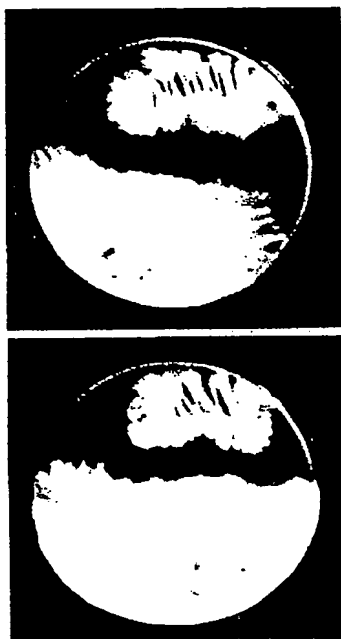
【図8】実施例4におけるペーパーディスクの様子を示す。

【図9】本発明の培養処理物から各種クロマトグラフィ＊

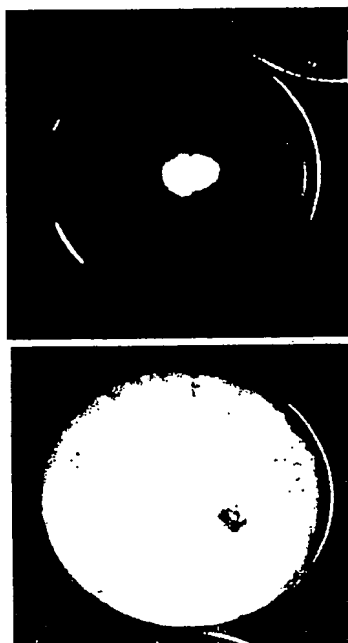
＊を用いて活性物質を含むフラクションを単離・精製するスキームを示す。

【図10】環状リボペプチドBacillopeptinA及びBacillopeptinBの化学構造を示す。

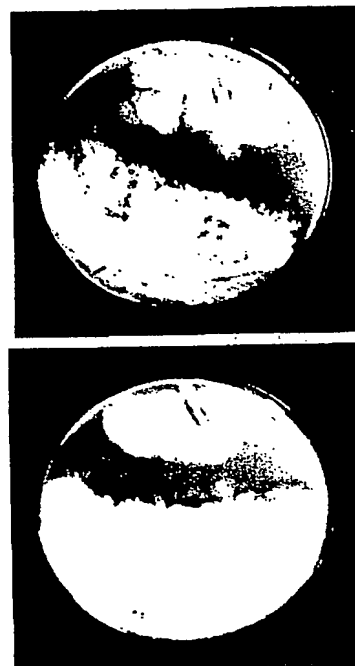
【図1】



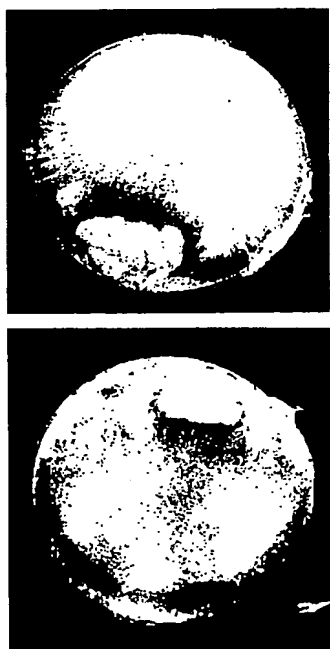
【図2】



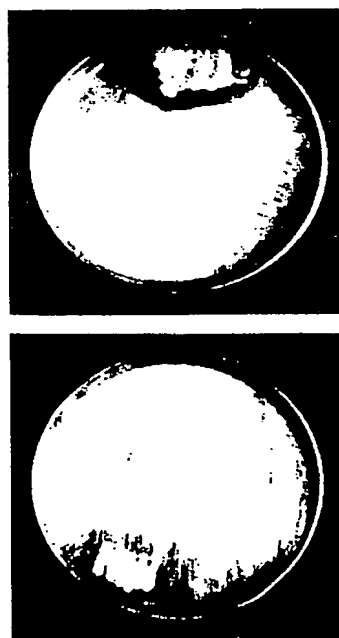
【図3】



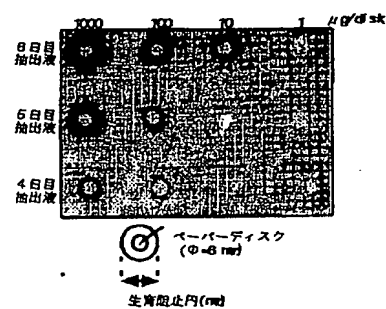
【図5】



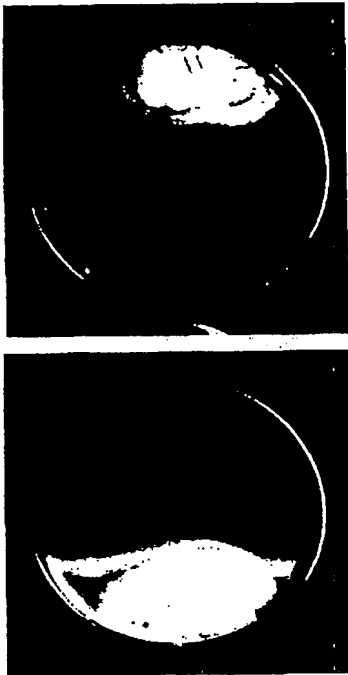
【図6】



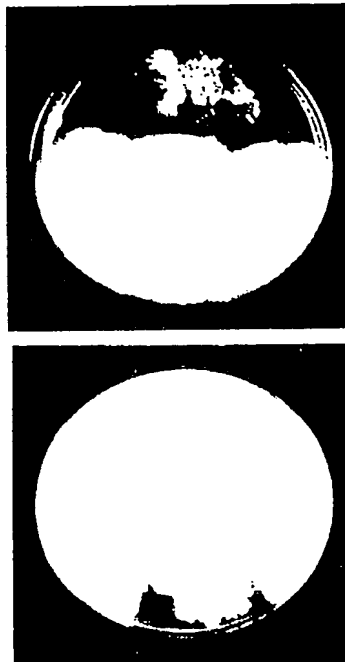
【図8】



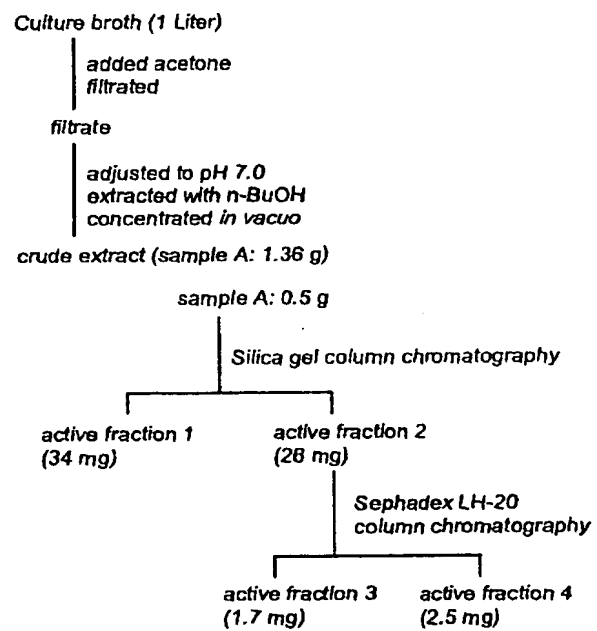
【図4】



【図7】

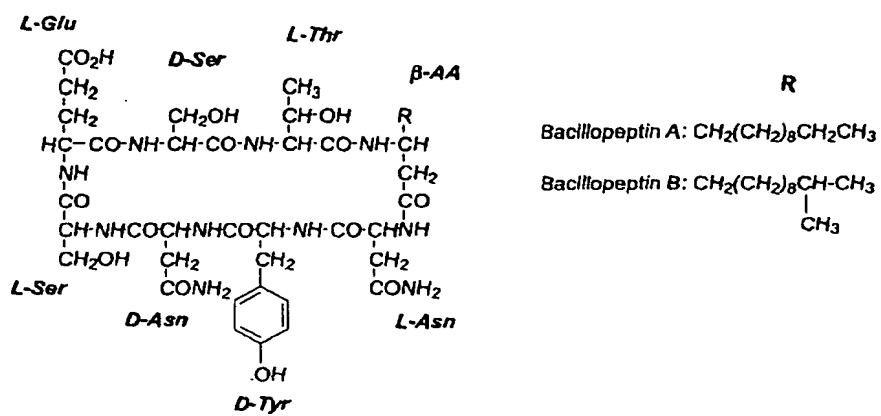


【図9】



活性物質の単離・精製スキーム

【図10】



Bacillopeptins A & B の化学構造

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B065 AA15X AC14 BA23 BD16
 CA34 CA47
 4H011 AA01 BA01 BB21 BC03 BC08
 DA15 DC05 DD03